

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, 123—127

Zur Methodik der Ammoniakbestimmung im Urin von Früh- und Neugeborenen: Vergleich zwischen Formoltitration und enzymatischer NH_4^+ -Bestimmung

Von H.-B. v. STOCKHAUSEN und MAIKE STRUVE

Kinderklinik und Poliklinik (Direktor Prof. Dr. H. G. Hansen) der Medizinischen Akademie Lübeck

(Eingegangen am 1. August/20. Oktober 1972)

Zahlreiche Verfahren zur NH_4^+ -Bestimmung im Blut und im Urin sind bisher angegeben und von anderer Seite auch wieder kritisiert worden. Die seit einigen Jahren für die Bestimmung von Ammoniak im Blut bekannte enzymatische Methode von KIRSTEN et al. ([1963], Biochem. Z. 337, 312—319), SCHMIDT & SCHWARZ ([1966], Klin. Wochenschr. 44, 591—592) sowie MÜTING et al. ([1970], Deut. Med. Wochenschr. 95, 1390—1396) wurde auf ihre Anwendbarkeit bei Urinuntersuchungen geprüft und mit der sehr einfachen Formoltitration hinsichtlich Spezifität und Reproduzierbarkeit verglichen. Die Formoltitration muß trotz guter Präzision wegen der erheblichen Beeinflussung durch Aminosäuren abgelehnt werden. Dagegen bietet sich gerade für Urinuntersuchungen von Früh- und Neugeborenen mit niedrigen NH_4^+ , jedoch relativ hohen Aminosäuren-Konzentrationen die enzymatische Ammoniakbestimmung an, die bei gleicher Präzision spezifisch ist und eine sehr gute Empfindlichkeit aufweist.

The determination of ammonia in the urine of premature and full-term newborns: Comparison of the formol titration and the enzymic NH_4^+ determination

Numerous methods for the determination of NH_4^+ in blood and urine have been described and subsequently criticized by other workers. The specificity and reproducibility of the enzymatic procedure for the determination of ammonia in blood according to KIRSTEN et al. ([1963], Biochem. Z. 337, 312—319), SCHMIDT & SCHWARZ ([1966], Klin. Wochenschr. 44, 591—592) and MÜTING et al. ([1970], Deut. Med. Wochenschr. 95, 1390—1396) was tested on urines by comparing it with the very simple formol titration method. The latter method is unsuitable in spite of its high precision, because of the marked influence exerted by amino acids. On the other hand the enzymatic NH_4^+ determination is applicable to the urines of premature and full-term newborns particularly because of the relatively low NH_4^+ level and the relatively high amino acid concentration. Its precision is equal to the formol titration method, but in addition it is specific and possesses a high sensitivity.

Zur Bestimmung von Ammoniak in biologischen Flüssigkeiten ist bis heute das Reagenz nach BERTHELOT am gebräuchlichsten (1, 2). Trotz wiederholter Abwandlungen, insbesondere bei Untersuchungen des Blutes, ist die Methode jedoch unbefriedigend geblieben, da die Reaktion nicht spezifisch ist und vor allem durch Aminosäuren, aber auch durch Harnsäure, Kreatinin und Sulfonamide beeinflusst wird (1—3). Auch bei Untersuchungen im Urin muß mit größeren Ungenauigkeiten gerechnet werden, wenn der Ammoniakgehalt, wie z. B. in der Neugeborenenperiode, relativ niedrig liegt, andererseits die Aminosäurenkonzentration im Urin von Frühgeborenen ein Vielfaches betragen kann (4). Zur exakten Bestimmung von Ammoniak im Blut und im Urin Neugeborener muß daher vor Durchführung der BERTHELOT-Reaktion eine Isolierung des Ammoniaks z. B. mit Hilfe der Mikrodifusionsverfahren nach CONWAY oder SELIGSON vorgenommen werden (1, 3, 5). Durch alkalische Hydrolyse einiger Aminosäuren wie Glutamin, Lysin, Arginin, Alanin und Serin können aber auch bei der im übrigen relativ aufwendigen Mikrodifusion etwas zu hohe Werte gewonnen werden (1—3, 5). Wohl wegen ihrer bestechenden Einfachheit ist gerade von Pädiatern die lange bekannte Formoltitration

(6) zur Bestimmung von Ammoniak im Urin wieder aufgegriffen worden, zumal man in einem Arbeitsgang die Titrationsazidität, Ammoniak und die Netto-Säure-Ausscheidung bestimmen kann (7—11). Andererseits ist vor einigen Jahren eine enzymatische Methode zur Bestimmung von Ammoniak im Blut von KIRSTEN et al., SCHMIDT & SCHWARZ sowie MÜTING et al. angegeben worden (12—14). Über die Verwendung dieser Methode zur NH_4^+ -Bestimmung im Urin liegen unseres Wissens bisher keine Erfahrungen vor. Als Voraussetzung für eigene NH_4^+ -Bestimmungen im Urin von Früh- und Neugeborenen galt es für uns zu prüfen, wie weit die enzymatische Methode für Untersuchungen im Urin anwendbar ist und im Vergleich zur einfachen, relativ verbreiteten Formoltitration zu befriedigenden reproduzierbaren Ergebnissen führt. Gleichzeitig sollte die Beeinflussbarkeit beider Methoden durch verschiedene physiologisch im Urin auftretende N-haltige Substanzen unter standardisierten Bedingungen untersucht werden.

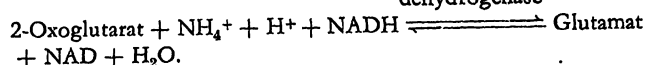
Methodik

Enzymatische NH_4^+ -Bestimmung

Prinzip

Für die enzymatische NH_4^+ -Bestimmung gilt folgende Reaktionsgleichung (12—14):

Glutamat-
dehydrogenase



Die relativ geringe Affinität des Ammoniumions zur Glutamatdehydrogenase wird durch einen Überschuß an Enzym ausgeglichen (12, 13). Bei genügend geringer Ammoniakkonzentration (unter 0,5 mmol/l) ist diese dem gebildeten NAD bzw. dem gemessenen Extinktionsabfall proportional.

Lösungen

1. Triäthanolamin-Puffer (50 mmol/l) mit EDTA (5 mmol/l), pH 7,5:
0,928 g Triäthanolamin-hydrochlorid und 0,186 g Na_2EDTA werden in etwa 80 ml Wasser gelöst und mit NaOH (4 mol/l) auf pH 7,5 eingestellt. Anschließend mit Wasser auf 100 ml auffüllen.
2. 2-Oxoglutarat-Lösung (34 mmol/l):
50 mg 2-Oxoglutarinsäure mit etwa 9 ml H_2O lösen, pH mit NaOH (1 mol/l) auf pH 7,0 einstellen und auf 10 ml mit H_2O auffüllen.
3. NADH-Lösung (3 mmol/l):
20 mg NADH auf 10 ml mit Triäthanolamin-EDTA-Puffer (50 mmol/l) lösen.
4. Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.2) in Glycerin (10 mg/ml).
Sämtliche Reagenzien zum Ansatz der Lösungen wurden von der Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen.

Vorgehen

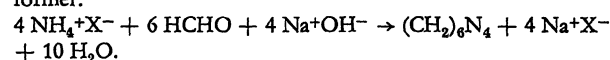
Die Untersuchungen erfolgten zunächst mit einem registrierenden Eppendorf-Photometer, später mit einem Elko III der Firma Carl Zeiss, bei 366 nm und einer Küvettenstichtdicke von 1 cm. Eine Entweißung des Urins war nicht erforderlich. Wegen der relativ hohen Ammoniak-Konzentration im Harn waren Verdünnungen mit Wasser bei Untersuchungen von Urinen Früh- und Neugeborener im allgemeinen im Verhältnis 1:10 bis 1:50 und von Urinen Erwachsener 1:100 bis 1:250 notwendig. Für alle Verdünnungen sowie zum Ansatz der Lösungen wurde frisch abgekochtes demineralisiertes bidest. Wasser verwendet.

In Küvetten wurden pipettiert	Leerwert (ml)	Probe (ml)
Lösung 1 (Puffer)	2	2
Urinprobe	—	1
Wasser	1	—
gut mischen und Küvetten verschlossen halten		
Lösung 2 (2-Oxoglutarat)	0,2	0,2
Lösung 3 (NADH)	0,2	0,2
nach Durchmischung Extinktion der Probe (E1 Probe) und des Leerwertes (E1 Leerwert) messen		
Lösung 4 (Glutamatdehydrogenase)	0,04	0,04

Die Reaktion kommt bereits nach 15 min zum Stillstand, so daß nach 20 min der Extinktionsabfall von Probe und Leerwert abgelesen werden kann. Die Berechnung der gesuchten Substratkonzentration NH_4^+ erfolgt nach den Angaben von BERGMAYER (15).

Formoltitration**Prinzip**

Die Formoltitration von Ammoniak erfolgt nach der Summenformel:



NH_3 kondensiert mit Formalin zu der schwachen Base Hexamethylentetramin. Bei pH 7,4 können praktisch alle Protonen des NH_4^+ mit NaOH titriert werden (6, 7).

Vorgehen

Die Methode wurde nach den Angaben von JÖRGENSEN und KILDEBERG (9) unter Verwendung eines Metrohm-Kombititrators 3 D gering modifiziert und stets bei 37°C durchgeführt (7, 9):

- a) 1 ml der zu untersuchenden Probe und 0,1 ml HCl (1 mol/l) wurden 5 min lang gerührt, womit der Urin bei pH < 4 frei von CO_2 und Carbonat ist; anschließend Titration mit NaOH (0,2 mol/l) bis pH 7,4
- b) darauf Zugabe von 5 ml einer Formaldehydlösung (75 g/l), die mit NaOH vorher auf pH 7,4 eingestellt wurde, sowie erneute Titration mit NaOH bis pH 7,4.
- c) zur Kontrolle einmalig 5 ml Formaldehyd und 0,1 ml HCl (1 mol/l) mit NaOH (0,2 mol/l) bis 7,4 titrieren, um den Leerwert zu erhalten.

Berechnung

Die registrierten Titrationsmengen a, b und c werden zur Berechnung der Titrationsazidität, des Ammoniaks und der Netto-Säure-Ausscheidung in folgende Formeln eingesetzt:

$$\text{Titrationssazidität [mmol/l]} = \frac{2a - 1}{10} \cdot 1000$$

$$\text{NH}_4^+ \text{ [mmol/l]} = \frac{2b - (2c - 1)}{10} \cdot 1000$$

$$\text{Netto-Säure-Ausscheidung [mmol/l]} = \text{NH}_4^+ + \text{Titrationssazidität}$$

Ergebnisse

Die beiden Methoden wurden durch Reihenmessungen an verschiedenen Urinproben und einem Ammoniak-Standard (14,5 mmol/l) verglichen und ihre Präzision bestimmt. In Tabelle 1 sind die Mittelwerte \bar{x} , ihre Standardabweichung s und der Variationskoeffizient VK von je 10 NH_4^+ -Bestimmungen desselben Standards auf enzymatischem Wege und durch Formoltitration sowie von 4 verschiedenen Urinen unterschiedlichen NH_4^+ -Gehaltes zusammengestellt. Die Reproduzierbarkeit kann danach für beide Verfahren als gleich gut angesehen werden. Der 95%-Bereich (± 2 s) liegt für beide Methoden zwischen ± 1 und 3 %.

Tabelle 2 zeigt die Einflüsse einer Reihe von Aminosäuren sowie von Cholin, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure und einer Albuminlösung auf die Bestimmung von Ammoniak in wäßriger NH_4^+ -Lösung und in einem bekannten NH_4^+ -Standard. Mit Hilfe der enzymatischen Methode konnte keinmal in den NH_4^+ -freien

Tab. 1

Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Formoltitration sowie der enzymatischen NH_4^+ -Bestimmung durch je 10 Messungen eines NH_4^+ -Standards sowie 4 verschiedener Urine

Probe	NH_4^+ [mmol/l] \bar{x}	s	Variations- koeffizient VK in %
Ammoniakstandard			
enzymatisch	14,57	0,08	0,54
Formoltitration	14,68	0,18	1,2
1. Urin enzym.	45,35	0,58	1,2
2. Urin enzym.	21,99	0,3	1,3
3. Urin Tit.	60,75	0,23	0,38
4. Urin Tit.	8,31	0,07	0,8

Lösungen Ammoniak nachgewiesen werden. Die Formoltitration führte dagegen bei Untersuchung derselben Lösungen zu einem irrtümlichen NH_4^+ -Gehalt, der genau dem Wert entsprach, um den die Bestimmung des NH_4^+ -Standards im Vergleich zur enzymatischen Methode zu hoch ausfiel. Während Cholin, Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure auf beide Methoden keinen Einfluß haben, kann die Anwesenheit von Aminosäuren zu erheblichen Abweichungen der Meßergebnisse bei der Formoltitration führen. Eine Umrechnung der gemessenen Differenzen auf 10 mmol/l Einwaage der jeweiligen Aminosäure (letzte Spalte der Tabelle 2) läßt erkennen, daß der Fehler in Gegenwart von Glycin und Cystein nahezu der Gesamtkonzentration der betreffenden

Aminosäure entspricht, während Prolin zu keiner Verfälschung der Ergebnisse führt. Zur Verdeutlichung des Unterschiedes zwischen den Aminosäuren Prolin und Glycin haben wir Titrationskurven der beiden Aminosäuren allein und nach Zugabe von Formaldehyd ebenfalls mit dem Metrohm-Kombitritrator 3 D aufgezeichnet (Abb. 1). Es muß betont werden, daß sich pK-Werte auf diese Weise nicht exakt bestimmen lassen, dennoch entsprechen die pK₂-Werte und die isoelektrischen Punkte (IP) nahezu den Angaben der Literatur (16, 17). Durch die große Menge an zugegebenem Formaldehyd verlaufen diese Kurven im oberen und unteren pH-Bereich flacher, zumal die gleiche Natronlaugekonzentration verwendet wurde. Dennoch unterscheiden

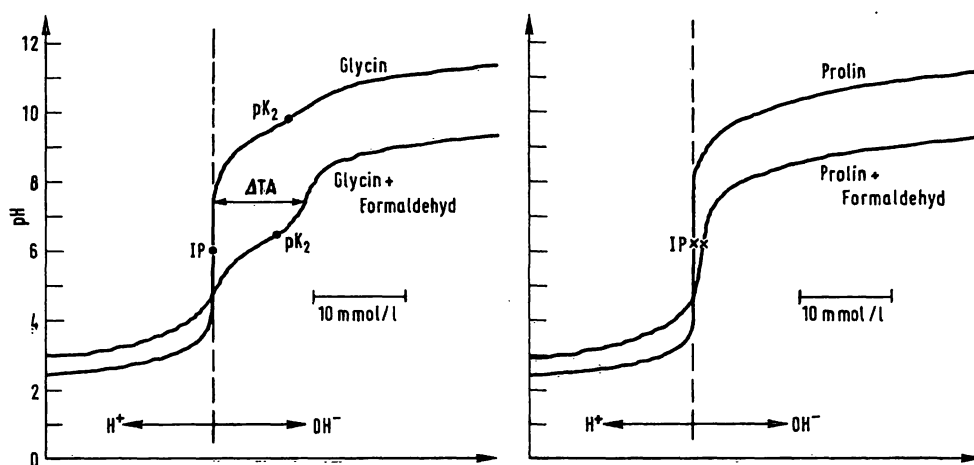


Abb. 1
Titrationskurven von Glycin und Prolin mit und ohne Zugabe von Formaldehyd

Tab. 2

Prüfung der Spezifität der enzymatischen NH_4^+ -Bestimmung sowie der Formoltitration. Verschiedene Aminosäuren und einige weitere N-haltige Substanzen wurden jeweils in wäßriger Lösung sowie in einem bekannten NH_4^+ -Standard untersucht. Die letzte Spalte zeigt eine Umrechnung der bei der Formoltitration zu beobachtenden Differenz bezogen auf 10 mmol/l eingesetzte Substanz

Enzymatische NH_4^+ -Bestimmung [mmol/l]			Formoltitration [mmol/l]		
Geprüfte Substanz	1 mg/ml Substanz	NH_4^+ - Standard + 1 mg/ml Substanz	1 mg/ml Substanz	NH_4^+ - Standard + 1 mg/ml Substanz	Umrechnung der Differenz auf 10 mmol/l eingesetzte Substanz
1. DL-Alanin	ø	14,7	4,2	18,7	3,74
2. L-Arginin	ø	14,9	4,5	18,8	7,8
3. L-Asparagin	ø	14,9	4,9	19,3	7,35
4. L-Cystein	ø	14,65	7,8	22,3	9,45
5. Glycin	ø	14,8	12,4	25,8	9,32
6. L-Histidin-Monochlorid	ø	14,7	0,5	14,9	1,04
7. L-Leucin	ø	14,7	2,2	16,8	2,88
8. L-Methionin	ø	14,7	4,2	18,7	6,26
9. L-Phenylalanin	ø	14,5	3,2	17,4	5,28
10. L-Prolin	ø	14,9	ø	14,8	ø
11. L-Tryptophan	ø	14,8	2,4	16,9	4,89
12. DL-Valin	ø	14,5	2,0	16,3	2,34
13. Cholinchlorid	ø	14,5	ø	14,5	ø
14. Kreatinin	ø	15,0	ø	14,6	ø
15. Harnstoff	ø	15,1	ø	14,3	ø
16. Harnsäure	ø*	15,0*	ø*	14,4*	ø*
17. Albuminlösung (2 g/l)	—	—	ø	14,4	—

* Wegen der schlechten Löslichkeit von Harnsäure beträgt die zugesetzte Substanzmenge nur 0,1 mg/ml

Tab. 3

Parallelbestimmung von Ammoniak im Frühgeborenen- und Erwachsenenurin mit Hilfe der Formoltitration und auf enzymatischem Wege zur Veranschaulichung der zu erwartenden prozentualen und absoluten Differenz des Meßergebnisses

Probe	Frühgeborene				Erwachsene			
	NH_4^+ - Titration mmol/l	NH_4^+ - enzymat. mmol/l	Differenz in %	Differenz absolut mmol/l	NH_4^+ - Titration mmol/l	NH_4^+ - enzymat. mmol/l	Differenz in %	Differenz absolut mmol/l
1.	3,8	3,3	13,2	0,5	26,0	24,6	5,3	1,4
2.	6,2	5,2	16,2	1,0	77,5	73,5	5,2	4,0
3.	6,6	5,9	10,6	0,7	61,5	53,4	13,2	8,1
4.	8,4	6,5	22,6	1,9	148,6	146,5	1,0	2,1
5.	8,2	7,2	12,2	1,0	23,8	19,0	20,0	4,8
6.	7,0	5,8	17,2	1,2	71,6	68,8	3,9	2,8
7.	5,4	4,6	14,8	0,8	15,7	15,2	3,2	0,5
8.	7,3	6,3	12,3	0,9	90,8	90,3	0,5	0,5
9.	11,4	9,9	13,2	1,5	37,9	36,9	2,6	1,0
10.	15,8	13,0	17,7	2,8	28,6	26,4	7,7	2,2
11.	6,2	4,8	22,6	1,4	34,0	26,6	21,7	7,4
12.	20,1	17,5	13,0	2,6	16,6	13,3	19,8	3,3
13.	4,9	4,1	16,3	0,8	19,2	13,6	29,0	5,6
14.	18,7	16,6	11,2	2,1	44,6	40,9	8,3	3,7
15.	8,8	7,4	15,8	1,4	14,4	11,1	22,8	3,3
16.	7,5	4,4	41,5	3,1	48,9	48,8	0,2	0,1
17.	22,4	21,8	2,7	0,6	15,8	15,4	2,5	0,4
18.	10,1	7,0	30,7	3,1	22,1	22,1	0,0	0,0
19.	15,3	9,4	38,5	5,9	89,8	81,7	8,9	8,1
20.	12,9	11,1	14,0	1,8	39,0	38,4	1,5	0,6

sich die Kurven für Prolin nicht wesentlich, während es beim Glycin zu einer erheblichen Verformung in Gegenwart von Formaldehyd kommt. Anhand der Titrationskurven des Glycins kann auch gezeigt werden, daß der Mehrverbrauch an Lauge (ΔTA) bis zu einem Endpunkt von pH 7,4 in Gegenwart von Formaldehyd nahezu 10 mmol/l beträgt und damit in etwa der eingesetzten Gesamtkonzentration an Glycin entspricht (18).

In Anbetracht des starken Einflusses einzelner Aminosäuren auf die Formoltitration und der bekannten vermehrten Ausscheidung von Aminosäuren im Harn von Früh- und Neugeborenen (4) haben wir schließlich die absolute und prozentuale Differenz zwischen beiden Methoden bei je 20 Doppelmessungen von Urinen Frühgeborener und Erwachsener bestimmt (Tab. 3). Die mittlere prozentuale Differenz betrug für den Erwachsenenurin 8,9% und für den Frühgeborenenurin 18,1%. Der Unterschied ist nach dem t-Test mit einem $p < 0,01$ signifikant. Eine Korrelation zwischen dem absoluten Fehler und der Höhe des Ammoniak-Gehaltes im Urin bestand bei einem $r = 0,168$ nicht.

Diskussion

Uns kam es darauf an, die Anwendbarkeit der enzymatischen NH_4^+ -Bestimmung bei Urinuntersuchungen zu prüfen, da uns ihre bisher relativ geringe Verbreitung ungerechtfertigt erschien. MÜTING erwähnt für Untersuchungen des Blutammoniakspiegels (14), daß die Reaktion gelegentlich schleicht. Wir konnten dies bisher nicht beobachten. Die graphische Registrierung der Reaktion zeigte, daß diese bereits nach 15 min abge-

schlossen ist. Regelmäßig wurde eine 10 min lange Konstanz der Extinktion beobachtet. Die Reaktion ist spezifisch und sehr empfindlich. Da man mehrere Proben nebeneinander ansetzen kann, ist der Zeitaufwand vor allem bei Reihenuntersuchungen kaum größer als mit der Titrationsmethode. Als kleiner Nachteil bei Urinuntersuchungen muß angesehen werden, daß die NH_4^+ -Konzentration nicht über 0,5 mmol/l in Anbetracht der relativ geringen Affinität von Glutamatdehydrogenase zu NH_4^+ (12, 13) betragen darf, so daß praktisch immer eine Verdünnung des Urins durchgeführt werden muß. Sehr exaktes Arbeiten und garantiert ammoniakfreies Wasser sind daher Voraussetzung. Kleinste Verunreinigungen werden allerdings durch die Korrektur mit einem Leerwert aufgefangen. Der Extinktionsabfall des Leerwertes sollte in der Regel nicht über 0,025 liegen und kann damit indirekt als Maßstab für fehlerfreies Arbeiten gelten. Nach KIRSTEN kann ein Extinktionsabfall des Leerwertes bis 0,013 auf Ammoniakbeimengungen der Enzym- und NADH-Lösungen zurückzuführen sein (12). Auch wenn die Formoltitration zur NH_4^+ -Bestimmung im Urin bestechend einfach ist und zu sehr guten reproduzierbaren Ergebnissen führt, muß sie für Untersuchungen von Urinen mit niedriger NH_4^+ -jedoch relativ hoher Aminosäurenkonzentration insbesondere bei Früh- und Neugeborenen abgelehnt werden. Hier bietet sich unseres Erachtens das enzymatische Verfahren als Methode der Wahl an, soweit nicht eine direkte NH_4^+ -Bestimmung durch eine in Erprobung befindliche NH_4^+ -Elektrode¹⁾ die Diskussion in Zukunft in eine ganz neue Richtung lenkt.

¹⁾ Colora Meßtechnik GmbH, Lorch/Württ.

Literatur

1. RICHTERICH, R. (1968), *Klinische Chemie*, 2. Aufl., S. 253—260. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. M. — 2. LORENTZ, K. (1967), *diese Z.* 75, 291—298. — 3. LORENTZ, K. & OSSENBERG, F. W. (1967), *Med. Lab.* 20, 77—88. — 4. BRODEHL, J. (1969), Der renale Transport der Aminosäuren im Säuglings- und Kindesalter. *Arch. Kinderheilk.*, Beiheft 16. — 5. RICHTERICH, R. & COLOMBO, J. P. (1962), *Ärzt. Lab.* 8, 129—141. — 6. BJÖRN-ANDERSEN, H. & LAURITZEN, M. (1910), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 64, 21—38. — 7. JÖRGENSEN, K. (1957), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 9, 287—291. — 8. BALLABRIGA, A. & MARTINEZ, M. (1969), *Helv. Paediat. Acta* 24, 111—117. — 9. KILDEBERG, P. (1968), *Clinical acid-base physiology. Studies in neonates, infants, and young children*, 1. Aufl., S. 31—36 Verlag Munksgaard, Copenhagen. — 10. KILDEBERG, P., ENGEL, K. & WINTERS, R. W. (1969), *Acta Paediat. Scand.* 58, 321—329. — 11. OETLIKER, O., CHATTAS, A. J. & SCHULTZ, S. M. (1971), *Helv. Paediat. Acta* 26, 523—534. — 12. KIRSTEN, E., GEREZ, C. & KIRSTEN, R. (1963), *Biochem. Z.* 337, 312—319. — 13. SCHMIDT, F. H. & SCHWARZ, M. (1966), *Klin. Wochenschr.* 44, 591—592. — 14. MÜTING, D., HEINZE, J., MOMPER, M. & SCHWARZ, M. (1970), *Deut. Med. Wochenschr.* 95, 1390—1396. — 15. BERGMAYER, H. U., BERNT, E., GRASSL, M. & MICHAL, G. (1970), in: *Methoden der enzymatischen Analyse* (BERGMAYER, H. U. Hrsg.) Bd. 1, 273—280, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. — 16. GRASSMANN, W., SCHNEIDER, F. & TRUPKE, J. (1951), in: *Lehr- und Handbuch der Physiologischen Chemie* (FLASCHENTRÄGER, B., Hrsg.) Bd. 1, 489—584, Verlag Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg. — 17. RAPOPORT, S. M. (1965), *Medizinische Biochemie*, 3. Aufl., S. 44—47, VEB-Verlag Volk u. Gesundheit, Berlin. — 18. LEVY, M. (1943), *Advanc. Enzymol.* 3, 454—458.

Dr. med. Hans-Burckhard v. Stockhausen
Kinderklinik der Medizinischen Akademie Lübeck
24 Lübeck
Kronsforder Allee 71/73